

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik und
dem Radiologie-Zentrum der Philipps-Universität
in Marburg/Lahn

ISOTOPENTECHNISCHE UND BIOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS DER
NÄHRLÖSUNG Z_{16} AUF DIE PROLIFERATION DES
WUNDBETTES VON HAUTWUNDEN AN DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

DAGMAR IBING
aus Hannover

Marburg 1974

Druck: Görlich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik und
dem Radiologie-Zentrum der Philipps-Universität
in Marburg/Lahn

ISOTOPENTECHNISCHE UND BIOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS DER
NÄHRLÖSUNG Z_{16} AUF DIE PROLIFERATION DES
WUNDBETTES VON HAUTWUNDEN AN DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

DAGMAR IBING
aus Hannover

Marburg 1974



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 21.12.1974
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Dekan: Prof.Dr.med.H.OEPEN
Referent: Prof.Dr.med.P.KLEIN
Correferenten: Prof.Dr.agr.E.SCHAUMLÖFFEL
Prof.Dr.med.dent. H.SCHNELL

Inhaltsübersicht

Seite

=====

I.	Einleitung und Problemstellung	3
II.	Methodik	13
	1. Übersicht	13
	1.1. Versuchsreihe I	13
	1.2. Versuchsreihe II	13
	2. Operation und Betreuung der Versuchstiere	14
	3. Applikation von ^3H -Thymidin und Excision des Wundbettes	15
	4. Aufbereitung der Proben zur Analyse	16
	4.1. Radioaktivitätsbestimmung	18
	4.2. Photometrie	18
	4.3. Histo-Autoradiographie	19
	4.4. Planimetrische Bestimmung der Wundflächen	19
	5. Statistische Auswertung der Ergebnisse	20
III.	Ergebnisse	21
	1. Versuchsreihe I	21
	2. Versuchsreihe II	23
IV.	Diskussion	26
V.	Zusammenfassung	29
VI.	Anhang	32
VII.	Literaturverzeichnis	43



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552328_0104

I. Einleitung und Problemstellung

Die Wundheilung ist ein oft beschriebenes Phänomen der Medizin, das die Ärzte durch Jahrhunderte hindurch beschäftigte und das auch heute noch viele Fragen aufwirft.

Bereits aus vorchristlicher Zeit (1500-500 v.Chr.) hat man Aufzeichnungen der Ägypter und Mesopotamier über eine systematische, weit entwickelte Wundbehandlung und "Wiederherstellungschirurgie" gefunden; das Berühren frischer Wunden war damals schon streng untersagt. Auch die Griechen und Römer beobachteten, daß Sauberkeit bei der Wundversorgung die Heilung günstig beeinflusst. HIPPOKRATES (466-377 v.Chr.) unterschied bereits eiternde von nichteiternden Wunden, und CORNELIUS CELSUS (25 v.Chr.-45 n.Chr.) empfahl in seiner Enzyklopädie "De Medicina", daß alle eiternden Wunden mit Fleisch aufgefüllt werden sollten. GALEN (129-199 n.Chr.) trennte dann als erster die sogenannte Wundheilung "per primam intentionem", bei der sich die Wunde komplikationslos schließt, von der sekundären, die durch Infektion und Substanzverlust gekennzeichnet ist.

Nach einigen Jahrhunderten ohne besondere Entdeckungen begann in der Renaissance erneut die Diskussion über dieses Thema. Man überlegte sich, wie die sekundär verheilenden Wunden "aufgefüllt" werden könnten; TAGLIACOZZA warf erstmals Ende des 16. Jahrhunderts die Frage der Transplantationen auf und führte auch schon autologe Fernplastiken durch. Es entstanden die verschiedensten Theorien und Hypothesen, die nach der Entdeckung des Blutkreislaufes durch WILLIAM HARVEY (17. Jahrh.) eine neue Richtung nahmen. Blut und Lymphe wurden nun bei der sekundären Wundheilung als Träger heilungsfördernder Substanzen angesehen.

Im 18. Jahrhundert wurden die ersten experimentellen Versuche durchgeführt; der Engländer JOHN HUNTER publizierte 1794 detaillierte Vorstellungen über die Gewebsheilung. Er unterschied zwischen einer spontanen Wundheilung, bei der die Wundränder aneinanderliegen und verkleben und einer Verheilung, bei der die Wundränder klaffen. Die Gewebslücke wurde dabei nach seiner Meinung entweder durch koagulierende Blutbestandteile, die auf dem Lymphwege herantransportiert wurden, oder durch das Einsprossen von Gefäßen in das Wundgebiet und sich bildende "Granulationen" geschlossen [11]. Diese Vorgänge konnten inzwischen von mehreren Seiten her analysiert und belegt werden und sind zu allgemein anerkannten Begriffen in der modernen Vorstellung über die Wundheilung geworden.

Nach HERNÁNDEZ-RICHTER [9] kann man den Vorgang der Wundheilung morphologisch in drei Phasen einteilen: in die exsudative, die proliferative und die reparative Wundheilungsphase, wobei die Erscheinungen der ersten Phase denen einer akuten Entzündung entsprechen. Für den Problemkreis der Wundheilung ist zunächst die Frage der Proliferation interessant, die auch Thema der vorliegenden Arbeit ist. Seit langem ist bekannt, daß die proliferative Phase durch besonders großen Zellreichtum gekennzeichnet ist. HEGEMANN [7] konnte feststellen, daß dieser Zellreichtum weniger auf eine Zellvermehrung als vielmehr auf die Mobilisierung der Zellen des Randepithels zurückzuführen ist. Er beobachtete außerdem eine Migration der der Wunde benachbarten Epithelzellen zum Zentrum des Gewebsdefektes hin. Man hat viele Untersuchungen und Beobachtungen über die Mobilisation der Zellen angestellt und entdeckt, daß Epithelzellen oder Fibroblasten, die nicht mehr in einem dichten Zellverband liegen, zu einer amöboiden Bewegung befähigt sind. Diese Zellen bilden, sobald ihre Membranen keinen Kontakt mehr zu Membranen anderer Zellen

halten, sogen. "ruffled membranes" [18] aus, mit denen sie sich an verschiedene Substrate binden können. Gleichzeitig lösen sich die Zellen vom darunterliegenden Gewebe und "fließen" in die Richtung der speziell ausgebildeten Membran. Dieser Vorgang kann so oft wiederholt werden, bis die einzelne Zelle mit einer anderen gleichartigen in Berührung und es damit zur "Kontakthemmung" [18] kommt. Sobald aber wieder ein kontaktfreies Stück der Membran vorhanden ist, bildet sich hier wieder eine "ruffled membrane" aus, der Zellkontakt wird aufgelöst, und die Zelle ist wieder "mobil". Man konnte feststellen, daß die Bewegungsrate pro Tag einige mm beträgt [18, S. 39]. Damit liegt zwar eine Erklärung für die Motilität der Zellen vor, nicht aber für die Entstehung der "ruffled membrane". Man nimmt an, daß die veränderte Zelloberfläche durch bei der Wundsetzung freigesetzte proteolytische Enzyme oder intrazelluläre Proteasen verursacht wird; der experimentelle Beweis hierfür steht allerdings noch aus.

Der Zellreichtum der Proliferationsphase resultiert auch aus einer ansteigenden Mitoseaktivität. Normalerweise kennt man bei der Regeneration von Geweben einen Tag-Nacht-Rhythmus, d.h. nachts ist die Mitoserate höher als am Tag. Bei der Haut ist das besonders ausgeprägt. Bei einer Verletzung bzw. einem Substanzverlust der Haut wird der Tag-Nacht-Rhythmus aufgehoben. Es kommt dann so lange zu einer gesteigerten Mitoseaktivität, bis die Regeneration abgeschlossen ist. Für die Ursache der Erhöhung der normalen Proliferationsrate bei einer Verletzung gibt es bisher noch keine eindeutige Erklärung. Man hat angenommen, daß bei der Heilung eines Wunddefektes die Zellteilung durch einen humoralen Faktor, ein sogen. Wundhormon, stimuliert wird. Versuche mit Haut-homogenisaten, die aus Zelldetritus gewonnen und injiziert

wurden, schienen das zunächst auch zu bestätigen. Inzwischen hat man aber festgestellt, daß bei höheren Dosen dieses Homogenisates der gegenteilige Effekt auftritt [18.S.40] . Die Untersuchungen anderer Autoren sprechen dagegen für das Vorhandensein eines solchen spezifischen Wundhormons; allerdings wirkt es erst nach mehrfacher Wundsetzung. HEGEMANN [8] führte bis zu acht Wundsetzungen pro Tier durch und konnte feststellen, daß die charakteristische Heilungsgeschwindigkeit mit jeder Wundgeneration zunahm, ohne daß dabei Umstellungen im Blutgefäß- oder Nervensystem zu beobachten waren.

Eine gesteigerte Zellproliferation erfordert eine vermehrte Sauerstoffzufuhr. Daher ist eine gleichzeitig zunehmende Neubildung von Kapillarendothelzellen notwendig; man hat beobachten können [9.S.17] , daß vom 2.-8.Tag nach Entstehung der Wunde eine "überschießende Kapillareinsprossung" in das Wundgebiet einsetzt. Außerdem sollen die Membranen der neugebildeten Kapillarsprossen eine größere Durchlässigkeit besitzen als die der schon länger vorhandenen [9] , sodaß der Stoffaustausch beschleunigt wird. So kommt es zur Bildung des stark vaskularisierten Granulationsgewebes.

Während der reparativen Phase des Wundheilungsvorganges spielt die Wundkontraktion eine wichtige Rolle. Sie wurde vor über 200 Jahren von JOHN HUNTER [11] erstmals beobachtet und ist bis heute ein viel untersuchtes Phänomen geblieben. Nach HEGEMANN [7] erfolgt die Reparation einer Hautwunde durch Granulation bzw. Epithelisation und Kontraktion, wobei sich größere Wunden oder solche mit beweglichen Wundrändern mehr durch Kontraktion, kleinere oder solche mit relativ unbeweglichen Wundrändern hauptsächlich durch Epithelisation schließen sollen. Auch BILLINGHAM und RUSSELL [2] fanden

heraus, daß die Größe der Wundkontraktion und damit die Heilungszeit von verschiedenen Faktoren abhängig ist: von der Form und Lage der Wunde, von ihrer Größe und vom Alter des Versuchstieres.

Es ist noch unklar, wie es zur Wundkontraktion kommt.

HEGEMANN [7] sieht die Ursachen auf Grund seiner Untersuchungen in der Retraktion des geronnenen Fibrins im Wundbett sowie in der zentralen Zugwirkung auf den Wundrand durch Dehydratation des Granulationsgewebes. Außerdem hat er beobachten können, daß die jugendlichen, unreifen Kollagenfasern im Wundgebiet eine andere Struktur aufweisen als die reifen Fasern. Die Polypeptidketten des jugendlichen Kollagens haben ein lockereres Gefüge und sind nicht so stark vernetzt. Erst bei der Reifung lagern sie sich dichter zusammen; dabei haben die Kollagenfasern die Fähigkeit zur Selbstspannung und unterstützen, da sie parallel zum Wundrand zirkulär angeordnet sind, die Wundkontraktion erheblich.

Auch CUTHBERTSON [5] hält die Möglichkeit eines Einflusses des Kollagens auf die Kontraktion nicht für ausgeschlossen; frühere Versuche bei an Skorbut erkrankten Tieren hatten zwar keinen Anhaltspunkt für eine veränderte Wundkontraktion gegeben, obwohl die Kollagenbildung bei dieser Hypovitaminose stark gehemmt ist. CUTHBERTSON führte aber den gleichen Versuch mit längerer Vorbereitungszeit durch, d.h. seine Tiere bekamen statt einer fünftägigen Diät vor Versuchsbeginn vierzehn Tage lang Diät; aus den Ergebnissen ging eine deutliche Verminderung der Wundkontraktion hervor.

PEACOCK und VAN WINKLE definieren die Wundkontraktion als "Prozeß, bei dem die Größe einer offenen, alle Schichten der Haut umfassenden Wunde durch die zentripetale Bewegung der peripheren Hautschichten vermindert wird" [18.S.49] .

Die Faktoren, die zu dieser Expansion des peripheren Gewebes führen, werden von den beiden Autoren allein in der Mobilisation und Migration der Epithelzellen gesehen. Sie können sich mit Hilfe der "ruffled membrane" in Richtung des Gewebsdefektzentrums fortbewegen, bis sie durch den völligen Kontakt mit anderen Zellen an der weiteren Migration gehindert werden. Aus diesen Kenntnissen kann man eine mögliche Erklärung für die Wundkontraktion ableiten, daß nämlich die Zellen des Randepithels zum Zentrum hin wandern und durch die netzartige Verbindung mit den peripheren Epithelzellen einen zentralen Zug auf sie ausüben. Damit wäre die Wundkontraktion als "ein quantitatives Phänomen, das von der Summe der Kräfte abhängig ist, die von individuellen Zellen innerhalb der gesamten Zellpopulation aufgebracht werden" [18], zu sehen. Wird diese Kraft von der zentrifugalen Kraft (zunehmende Spannung des peripheren Gewebes) überwunden, so ist die Wundkontraktion aufgehoben. Das konnte durch verschiedene Versuche [18] bestätigt werden.

BILLINGHAM und RUSSELL [2] nehmen dagegen auf Grund ihrer Untersuchungen an, daß der Wirkfaktor für die Wundkontraktion möglicherweise in den mesenchymalen Zellen des Granulationsgewebes zu finden ist.

Bei der Untersuchung dieser Fragen ist man schon mehrfach auf einige Faktoren gestoßen, die die Wundheilung positiv beeinflussen. So hat man festgestellt, daß eine höhere Temperatur, ein feuchter Wundverband ("feuchte Kammer") oder ein erhöhter O_2 -Druck in der umgebenden Atmosphäre die Heilungsdauer bedeutend abkürzen können. Auch Veränderungen im Ionenmilieu spielen dabei eine Rolle. Die Reißfestigkeit - normalerweise ein sicheres Zeichen für die abgeschlossene Wundheilung - wird in vergleichbarer Zeit

erheblich gesteigert, wenn man gelöstes Kollagen appliziert [9] oder Chondroitinsulfat A [16] und Histamin zuführt. Die orale Applikation von Zink kann die Heilungsdauer auf 50 % der Zeit verkürzen [19] .

Man hat ferner festgestellt, daß bestimmte Aminosäuren, z.B. Asparagin, einen positiven Einfluß auf die Dauer des Heilungsvorganges haben können; auch die lokale Applikation von Organ- oder Embryonalextrakten hat bei den Untersuchungen mancher Autoren zu einer sichtlichen Verkürzung des Heilungsprozesses geführt, während andere wiederum diesen "Stimulantien" keine Bedeutung zumessen.

Die lokale Anwendung von Vitamin A bzw. Vitamin-A-Säure kann allerdings als sicherer Beschleunigungsfaktor der Wundheilung betrachtet werden. Mit Hilfe von autoradiographischen Untersuchungen wurde bei der lokalen Anwendung von Vitamin-A-Säure eine Epidermishyperplasie und eine maximal gesteigerte DNS-Syntheserate nachgewiesen [3] . Dies konnte anhand einer Untersuchung bestätigt werden, bei der bei dreitägiger Vorbehandlung mit 1%iger Vitamin-A-Säure eine um 17 % beschleunigte Wundheilung von Standardwunden festgestellt wurde [13] .

Bei den Versuchen, menschliche Haut durch Gewebezüchtung zu gewinnen, ergab sich häufig die Schwierigkeit des Überwachsens von Fibroblasten über das Epithel, wodurch die mitotische Aktivität und die Ausdifferenzierung des Epithels fast vollständig unterdrückt wurden. Dadurch waren die Ergebnisse oft unbefriedigend. Im Jahre 1950 gelang es M. PARSHLEY und H.S. SIMMS [17] in den USA, eine hautepithelspezifisch wirksame Nährlösung (Z_{16}) für in-vitro-Kulturen zu entwickeln, die das Fibroblastenwachstum weitgehend verhinderte. Diese sogen. Z_{16} -Lösung besteht im wesentlichen aus einer Aminosäure und Salzen und hat einen gegenüber dem physiologischen leicht sauren pH-Wert ($\approx 6,9$).

Die genaue Zusammensetzung ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

	Molekulargew.	g/Liter	mM/Liter
NaCl	58,5	6,80	116,4
KCl	74,5	0,17	2,3
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203,0	0,173	0,85
Na ₂ HPO ₄	142,0	1,28	9,0
Dextrose	180,0	0,85	4,7
Asparagin- säure	133,0	3,0	22,5
NaOH	40,0	0,77	19,2
Sulfamethazin	214,0	0,75	3,5
Phenolrot	354,0	0,075	0,21

Tabelle 1. Z₁₆-Lösung (pH=6,9) nach M.PARSHLEY u.H.S.SIMMS.
1950.

Durch zahlreiche Untersuchungen und Erfahrungen in der klinischen Anwendung konnte inzwischen bewiesen werden, daß unter ständiger Befeuchtung mit Z₁₆ der Wundheilungsvorgang beschleunigt, ja sogar um ca. 50 % verkürzt werden kann [13]. Man könnte annehmen, daß der feuchte Wundverband allein bereits den Heilungsprozeß begünstigen kann; man hat bei vergleichenden Versuchen mit Z₁₆ und 0,9%iger NaCl-Lösung jedoch beobachtet, daß die mit der Nährlösung befeuchteten Wunden einen schnelleren Heilungsverlauf zeigten als die, bei denen nur die feuchte Kammer simuliert wurde. Die mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wunden stimmten in ihren Ergebnissen sogar mit denen der unbehandelten Wunden überein [13]. Der Autor kann auf Grund dieser Ergebnisse

und seiner histo-autoradiographischen Untersuchungen nachweisen, daß die Nährlösung Z_{16} eine maximal gesteigerte Proliferation im stratum basale des randständigen Epithels stimulieren kann. Außerdem kann man bei der Behandlung von chronisch-ulzerierenden Wunden mit Z_{16} eine starke Granulation und Vaskularisation im Zentrum des Wundgebietes beobachten [13]. Es drängt sich daher die Frage auf, ob die Nährlösung auch im Gebiet des Wundbettes einen Einfluß auf die Proliferation nimmt. Man müßte dann eine höhere Mitoserate auch in diesem Gebiet nachweisen können, da ein größerer Anteil von Zellen aus der G_0 -Phase in den Generationszyklus eintritt.

Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag geleistet werden zur Klärung der Frage, ob bei Wundbehandlung mit der Nährlösung Z_{16} im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle eine Steigerung der Proliferationsrate der Zellen des Wundbettes in Zusammenhang mit dem schnelleren Verschluß der Wunde gebracht werden kann. Bei Anwendung entsprechender isotopentechnischer und biochemischer Methoden in der Bearbeitung dieses Fragenkomplexes ergibt sich ebenfalls die Möglichkeit, über die Bestimmung der Konzentrationen an freiem und utilizedem Vorläufer eine relative Aussage über eine gesteigerte Vaskularisation des Wundgebietes zu machen.

Als sichere Nachweismethode für die Proliferationsgröße bietet sich die Bestimmung der Einbaurate von i.p. oder i.v. appliziertem 3H -Thymin in die DNS der Zellen des Wundbettes an. Dieses Nukleosid wird bei der Biosynthese der DNS utillisiert. Nach Verteilung des 3H -Thymin im körpereigenen Pool dieses DNS-Vorläufers stellt die 3H -Radioaktivität ein Maß für die Größe der Utilisation von Thymin in der DNS-Synthese dar.

Um einen Unterschied bezüglich der mitotischen Aktivität zwischen Zellen unbehandelter und Zellen behandelter Wunden feststellen zu können, muß die spezifische Aktivität der DNS, d.h. die pro Gewichtseinheit DNS eingebaute ^3H -Thymidin-Radioaktivität, bestimmt werden. Das angebotene Thymidin wird nur in Zellen eingebaut, die gerade die S-Phase durchlaufen. Durchschnittlich befinden sich nur ca. 30 % der Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt in der G_1 - und S-Phase. Das bedeutet, daß bei einer globalen Radioaktivitätsbestimmung des Wundbettes auch das freie, d.h. nicht eingebaute Thymidin mitberechnet wird. Zur Erfassung des utilisierten ^3H -Thymidin wurde deshalb bei dieser Untersuchung das freie Thymidin von dem in die DNS eingebauten Anteil durch Vorextraktion isoliert bestimmt.

Durch photometrische Bestimmung der DNS ist über die Radioaktivitätsbestimmung sowohl der Anteil an utilizedem ^3H -Thymidin/Gewichtseinheit Wundbett als auch die spezifische Aktivität der DNS, d.h. der ^3H -Thymidin-Einbau/Gewichtseinheit DNS, möglich. Die Bestimmung der Konzentration an freiem Vorläufer/Gewichtseinheit Wundbett ist insofern von Bedeutung, als bei vermehrter Vaskularisation auch der Anteil an Vorläufern erhöht sein kann. Hier wäre möglicherweise ein Anhaltspunkt für die Durchblutungsgröße gegeben.

Mit Hilfe der Histo-Autoradiographie ist es möglich, über die Bestimmung der prozentualen Anteile radioaktiv markierter Zellen/Gesamtzellzahl (^3H -Index) die Proliferationsgröße zu erfassen. Die Anwendung dieser Methodik bei behandelten und unbehandelten Wunden erlaubt somit eine Aussage darüber, ob die beobachtete verkürzte Wundheilung bei einer Z_{16} -Behandlung im Vergleich zur Kontrolle auf einer gesteigerten

Proliferation der Zellen des Wundbettes beruht.

Wir führten an der Ratte derartige vergleichende isotope-technische Untersuchungen durch, über deren Methodik und Ergebnisse anschließend berichtet wird.

II. Methodik

=====

1. Übersicht

Die Untersuchungen wurden in zwei Versuchsreihen an 190-220 g schweren, weiblichen weißen Inzuchtratten (Züchter: IVANOVAS, Kisslegg/Allgäu) durchgeführt.

1.1. Versuchsreihe I

In dieser Versuchsreihe wurden drei Gruppen von je acht Tieren in zufälliger Reihe operiert und analysiert: eine O-Gruppe, bei der Wundsetzung, ^3H -Thymidin-Injektion und Excision am gleichen Tag in zeitlich entsprechendem Abstand vorgenommen wurden, um einen Ausgangswert zu erhalten; eine Kontrollgruppe (unbehandelt) und eine Versuchsgruppe (mit Z_{16} behandelt), bei denen die Injektion von ^3H -Thymidin und die Excision des Wundbettes am 4. postoperativen Tag erfolgte.

1.2. Versuchsreihe II

Hierbei wurde auf die O-Gruppe verzichtet; es wurden eine Kontrollgruppe à 12 Tiere und eine Versuchsgruppe à 10 Tiere untersucht. Für die Histo-Autoradiographie wurden 2 unbehandelte und 2 behandelte Tiere in zufälliger Reihe aus den jeweiligen Gruppen genommen.

Der 4. postoperative Tag wurde deshalb als Versuchstag festgelegt, weil man dann schon mit Sicherheit annehmen konnte, daß auch in den unbehandelten Wunden bereits die physiologisch bedingte Kapillareinsprossung eingesetzt und man dadurch einen adäquaten Vergleichswert hatte. Außerdem konnte in Vorversuchen bestätigt werden, daß die Wundheilung nach den ersten zehn Tagen bereits zu 75 % abgeschlossen ist [14].

2. Operation und Betreuung der Versuchstiere

Die Operations- und Verbandstechnik konnte auf Grund früherer ähnlicher Untersuchungen mit Ratten übernommen werden [13].

Den Tieren wurde in Allgemein-Äthernarkose distal der Schulterblätter in der Mitte des Rückens eine einheitliche, ca. 450 mm^2 große Wunde gesetzt, die bis auf die Faszie der Rückenmuskulatur reichte. Die Standardisierung der Wundfläche wurde mit Hilfe eines Stempels erreicht, der in dem rasierten Hautareal die Excisionslinie markierte. Die Wundsetzung erfolgte vormittags. Nach der Operation wurde die Wunde mit einem Stück Fucidine-Gaze bedeckt, um zu verhindern, daß der Verband mit der Wunde verkleben und dadurch die Wundheilung stören könnte. Um bei den Versuchsgruppen die Wirkung einer feuchten Kammer im Bereich der Wunde erzielen zu können, wurde ein feuchtigkeitspeicherndes Material (Zellstoff) auf die Gaze gelegt und beides mit einem Schlauchverband (tubegauz Nr. 2), der den Ratten übergestreift wurde, fixiert. Für Kopf, Extremitäten und Schwanz wurden Löcher in den Schlauchverband geschnitten, sodaß sich die Tiere frei bewegen konnten. Eine Gummischlauchzwinge fixierte den Verband am Hals und verhinderte, daß die Tiere ihn abbeißen konnten.

Die Kontrollgruppen wurden in der gleichen Weise verbunden, um vergleichbare Versuchsbedingungen herzustellen.

Alle Tiere wurden in Einzelkäfigen mit Torfeinlage untergebracht.

Futter: Standard-Rattennahrung Altromin ad libitum

(Hersteller:ALTROGGE,Lage i.Lippe)

Zusammensetzung: 10,8 % Wassergehalt

7,0 % Asche

18,0 % Rohprotein

4,0 % Fett

5,3 % Rohfaser

54,9 % N-freie Extraktstoffe

Wasser: ad libitum aus Einzeltropfflaschen

Raumtemperatur: 23° C

Bei den Versuchsgruppen wurden alle 6 Stunden mindestens 10 ml Z₁₆-Lösung über den Verband verteilt,damit die Wunden möglichst ununterbrochen feucht gehalten wurden.

3. Applikation von ³H-Thymidin und Excision des Wundbettes

Für die Versuche wurde ³H-Thymidin verwendet,das in der Methylgruppe radioaktiv markiert war (2-5 Ci/mMol, Firma AMERSHAM-BUCHLER,Braunschweig).

Jedem Tier der Versuchsreihe I wurden 100 µCi ³H-Thymidin in 0,4 ml verdünnter Lösung (1 mCi in 4,4 ml 0,9%iger NaCl-Lösung) intraperitoneal injiziert.

Die Tiere der Versuchsreihe II erhielten je 50 µCi ³H-Thymidin in 0,2 ml verdünnter Lösung intravenös über die freigelegte vena femoralis,da aus den Ergebnissen der Versuchsreihe I ersichtlich war,daß auch die Hälfte der ursprünglich gegebenen Dosis ausreichte.

Die für die histo-autoradiographische Auswertung vorgesehenen Katten erhielten 200 μ Ci ^3H -Thymidin (0,2 ml unverdünnt) ebenfalls intravenös. Das Spritzengewicht wurde jeweils vor und nach der Injektion bestimmt.

Zwei Stunden nach der Applikation von ^3H -Thymidin erfolgte die Excision des Wundbettes in Äthernarkose. Anschließend wurden die Tiere durch eine Überdosis Äther getötet.

^3H -Thymidin-Injektion und Excision des Wundbettes wurden am frühen Nachmittag durchgeführt. Das excidierte Gewebe wurde gewogen und zur Analyse aufbereitet.

4. Aufbereitung der Proben zur Analyse

Versuchsreihe I

Nach Bestimmung des Frischgewichtes wurde ein aliquoter Teil des jeweiligen Excisionsmaterials zur Gesamt-Radioaktivitätsbestimmung entnommen. Das restliche Excisionsmaterial wurde mit einem Glaspotter (Mini Potter der Firma BRAUN, Melsungen) homogenisiert unter Zusatz von 2 x 0,5 ml Chloroform-Methanol (2:1). Das gesamte Homogenisat wurde in eine Glasfritte (G 3) übergeführt und die Extraktionslösung durch Anlage eines Vakuums (Wasserstrahlpumpe) abgesaugt. Der Rückstand wurde nochmals mit 2 ml Chloroform-Methanol (2:1) auf der Fritte nachgewaschen (Extraktionsfraktion A). Anschließend wurde das Homogenisat mit 4 ml eisgekühltem Äthanol (unvergällt), 4 x 4 ml eisgekühlter Trichloressigsäure (TCA 5 %) und 5 ml H_2O -Alkohol (1:1) gewaschen und die Filtrate der Waschlösung vereinigt (Extraktionsfraktion B). Danach wurde zweimal mit je 4 ml Äthanol-Äther (1:3) gewaschen (Extraktionsfraktion C). Der Rückstand wurde in 40 ml TCA (5 %) unter

Schütteln 30 Minuten bei 92°C in einem Wasserbad (Ultra-Thermostat) erhitzt (Extraktionsfraktion D bzw. DNS-Fraktion). Diesem heißen TCA-Extrakt wurde ein aliquoter Teil für die photometrische Bestimmung der DNS entnommen; der Rückstand wurde gewogen und in einem aliquoten Teil die Radioaktivität bestimmt.

Die Extraktionsfraktionen A, B und C dienten zur Abtrennung der freien Vorläufer und der Lipide. Die Extraktionsfraktion D (DNS-Fraktion) repräsentierte den Anteil an utilizedem ^3H -Thyminidin.

Die Bestimmung der ^3H -Thyminidin-Aktivität des Frischgewicht-anteiles und des Rückstandes wurde nur zur Kontrolle der anderen Ergebnisse durchgeführt. Im Rückstand aller drei Gruppen verblieb eine mittlere, nicht extrahierbare Aktivität von ca. 10 % der Gesamtaktivität mit einer Standardabweichung von rund 30 %.

Versuchsreihe II

In dieser Versuchsreihe wurde auf die Extraktion der Lipide verzichtet, da hier keine photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration durchgeführt wurde. Die Ergebnisse der Versuchsreihe I zeigten nämlich, daß parallel zur Utilisation auch der DNS-Gehalt/g Gewebe und damit die Zellzahl/g Gewebe übereinstimmten. Um den möglichen Fehler einer unterschiedlichen Markierung des Pools an freiem Thyminidin durch z.B. verschieden hohe Resorptionsgrößen auszuschalten, wurde bei sonst gleicher Behandlung der Tiere am 4. postoperativen Tag ^3H -Thyminidin intravenös appliziert. Unter Verzicht auf eine photometrische Analyse wurden die freien Vorläufer mit Perchlorsäure (HClO_4 , 7 %) extrahiert, da hier die auf diese Weise nicht isolierten Lipide auf die Radioaktivitätsbestimmung keinen Einfluß hatten.

4.1. Radioaktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der ^3H -Thymidin-Radioaktivität wurden nach Gefriertrocknung (Firma LEYBOLD, Modell GT II) aus den Extraktionsfraktionen der homogenisierten Gewebstücke (A,B,C und D der Versuchsreihe I, Perchlorsäureextrakt der Versuchsreihe II) aliquote Teile in Probenmeßgläschen pipettiert. Die Extraktionsfraktionen A und C der Versuchsreihe I wurden mit 15 ml einer 20%igen äthanolischen Scintillationslösung (5,5 g Permablend III in 200 ml Äthanol + Toluol ad 1000 ml) versetzt. Zu den Extraktionsphasen B und D (TCA-Extrakt) der Versuchsreihe I und dem Perchlorsäureextrakt der Versuchsreihe II wurden jeweils 10 ml Insta-Gel (Firma PACKARD) zugegeben.

Die Extraktionsrückstände beider Versuchsreihen und der Frischgewichtanteil der Versuchsreihe I wurden nach Gefriertrocknung in einem Verbrennungsautomaten (Oxidizer, Typ 305, Firma PACKARD) zu $^3\text{H}_2\text{O}$ verbrannt, dessen Radioaktivität nach dem Versetzen mit 10 ml Insta-Gel bestimmt wurde.

Die ^3H -Thymidin-Radioaktivität wurde in einem 3-Kanal-Flüssig-Scintillationsspektrometer (Modell 3380, Firma PACKARD) mit automatischer Korrektur der Löscheffekte und Datenausgabe in absoluter Aktivität (dpm=Zerfälle/min) bestimmt. Die Meßzeiten waren so gewählt, daß die Standardabweichung der Einzelmessung unter 3 % lag.

4.2. Photometrie

Die photometrische Bestimmung der DNS (Versuchsreihe I) wurde mit aliquoten Teilen der DNS-Fractionen (Extraktionsfraktion D) der einzelnen Excisionsproben durchgeführt.

Photometriert wurde der Farbkomplex aus DNS und Diphenylamin ($C_{12}H_{11}N$) nach der Methode von BURTON. Die Eichkurve ergab sich aus 6 Proben à 20,40,50,60,80 und 100 μg DNS in TRIS-Puffer (0,067 M, pH-Wert=7,9; Inkubation: 12 Stunden bei Zimmertemperatur) gelöst (1 mg DNS/ml TRIS). Eichkurve siehe Anhang. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden bei $30^{\circ} C (\pm 5^{\circ} C)$ wurde die Extinktion ($\mathcal{E}$) der Proben in Quarzküvetten (Schichtdicke=1 cm) in einem Spektralphotometer (Firma ZEISS, Wellenbereich 600 nm) gemessen. Die Konzentration der DNS wurde für die jeweilige Probe über die Extinktion aus der Eichkurve abgelesen.

4.3. Histo-Autoradiographie

Die Excisionsproben der Tiere der Versuchsreihe II, denen 200 μCi 3H -Thymidin-Lösung injiziert worden waren, wurden in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden von dem Probenmaterial in den Paraffinblöcken Schnitte von 4-5 μ Dicke angefertigt, die entparaffiniert und auf Objektträgern mit Chrom-Alaun-Gelatine (0,9%) fixiert wurden. In einer aufsteigenden alkoholischen Reihe erfolgte die Denaturierung der Proteine und die Fixation durch Dehydratation. Anschließend wurden KODAK Stripping Plates AR 10 über das Präparat gestreift und auf der unteren Seite des Objektträgers mit Chrom-Alaun-Gelatine (0,9%) fixiert. Die Präparate wurden 17 Tage exponiert. Danach wurden die Filme entwickelt (Entwickler D 19 b), fixiert, kurz gewässert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

4.4. Planimetrische Bestimmung der Wundflächen

Bei der Versuchsreihe II wurde eine Bestimmung der Wundflächengröße durchgeführt. Die Wunden sowohl der Kontrollgruppe als auch der Versuchsgruppe wurden kurz vor der Excision sorgfältig abgepaust. Der mittlere Durchmesser der

Wundflächen wurde aus 8-10 Messungen mit dem Stechzirkel aus den Pausen ermittelt und die Größe der Wundfläche nach der Formel Kreisfläche = πr^2 errechnet.

5. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Von den parallelen Ergebnissen der Radioaktivitätsbestimmung und der photometrischen Bestimmung der DNS wurden die Mittelwerte errechnet. Aus diesen Werten wurde die spezifische Aktivität (dpm/g) des ^3H -Thymidin in Frischgewebe, Extraktionsfraktionen und Organrückständen nach Extraktion und die spezifische Konzentration der DNS (DNS/g Gewebe) ermittelt. Die Ergebnisse in dpm/g der beiden Versuchsreihen wurden nun unter Korrektur auf gleiche Dosis bei gleichem Körpergewicht in % relative spezifische Aktivität umgerechnet. Formel:

$$\text{rel. spez. Akt. } [\%] = \frac{\text{spez. Akt. } [\text{dpm/g}] \cdot \text{Körpergewicht } [\text{g}] \cdot 100}{\text{Dosis } [\text{dpm}]}$$

100% relative spezifische Aktivität entsprechen somit der durchschnittlich pro g Tier applizierten ^3H -Thymidin-Aktivität bzw. der durch diese Radioaktivität repräsentierten Konzentration an Gesamt-Thymidin pro g Tier.

Für die Versuchsreihe I wurde zusätzlich aus der Bestimmung der spezifischen Konzentration der DNS und der Radioaktivität in der DNS/g Gewebe die spezifische Aktivität der DNS (dpm/mg DNS) berechnet.

Bei der histo-autoradiographischen Analyse (Versuchsreihe II) wurde der ^3H -Index bei 112 Präparaten von zwei Versuchs- und Kontrolltieren ermittelt. Es wurden nur solche Zellen als markiert betrachtet, die mehr als 10 Silberkörner pro Zelle

erkennen ließen. Zur Auswertung gelangten auf Grund qualitativer Parameter 65 Schnitte.

Die Ergebnisse der Extraktionsfraktionen A,B und C der Versuchsreihe I wurden für die statistische Auswertung für jedes Versuchstier gemeinsam gemittelt, da alle drei Fraktionen die Konzentration an freiem ^3H -Thymidin repräsentierten und eine Aufteilung nur als Kontrollmöglichkeit vorgenommen worden war.

Alle von den einzelnen Tieren gewonnenen Ergebnisse der Versuchsreihen I und II wurden gemittelt und die Standardabweichung (Formel: $\sigma_E = \sqrt{\frac{\sum (x-M)^2}{(n-1)}}$, für alle Einzelwerte bestimmt. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Untersuchungsergebnisse der jeweiligen Gruppen wurden mit Hilfe des inhomogenen t-Testes nach STUDENT (Formeln siehe Anhang) als biologisch signifikant angesehen, wenn sich $p < 0,05$ ergab.

III. Ergebnisse

=====

1. Versuchsreihe I

Die Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmung für die C-Gruppe und die Kontroll- und Versuchsgruppe vom 4. postoperativen Tag und die Einzelwerte der photometrischen Analyse sind den Tabellen 6-9 im Anhang zu entnehmen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen basieren auf je 8 Einzelwerten/Gruppe. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse dieser statistischen Auswertung.

Versuchsreihe I			rel.spez.Akt. [°] der Extraktions- fraktionen	spez.DNS- Konzentration	spez.Aktivität der DNS	
Gruppe	n		A, B und C	D	[mg DNS/g]	[dpm/mg DNS]
O-Gruppe	8	$\bar{M}$	20,83	4,15	3,2	12 860
		σ_E	13,46	2,44	0,0	8 133
Kontroll- gruppe (unbehan- delt)	8	$\bar{M}$	16,72	46,78	6,0	75 604
		σ_E	7,16	24,47	1,0	35 383
Versuchs- gruppe (behan- delt)	8	$\bar{M}$	14,64	35,11	5,5	76 664
		σ_E	4,56	10,63	2,2	43 638

Tabelle 2. Mittelwert $\bar{M}$ und Standardabweichung σ_E für die relative spezifische Aktivität [%] der Extraktionsfraktionen A,B und C und der DNS-Fraktion D sowie für die spezifische DNS-Konzentration im Wundbett [mg DNS/g] und die spezifische Aktivität der DNS [dpm/mg DNS] aller drei Gruppen der Versuchsreihe I.

Aus der Tabelle 2 kann man deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen der O-Gruppe und denen der beiden anderen Gruppen in der Versuchsreihe I entnehmen. Ein Vergleich der Mittelwerte der relativen spezifischen Aktivitäten der Extraktionsfraktionen A,B und C, die zur Abtrennung von freien Vorläufern (A,B) und Lipiden (C) gewonnen wurden, ergibt bei der O-Gruppe einen um rund 25 % höheren Wert als bei den beiden anderen Gruppen. Der unvermeidliche Analysenfehler bedingt die relativ hohen Streuungen der Mittelwerte, sodaß eine Signifikanz der Unterschiede in der Konzentration an freien Vorläufern zwischen der O-Gruppe und den beiden Gruppen des 4.postoperativen Tages nicht

besteht ($p > 0,05$). Doch zeigt sich die sichere Tendenz, daß am Tag der Wundsetzung der Prozentsatz an nicht utlisiertem ^3H -Thymidin höher zu liegen scheint als vier Tage später.

Im Gegensatz dazu ist am 4.postoperativen Tag sowohl ein doppelter DNS-Gehalt/g Gewebe als auch ein höherer Anteil an utlisiertem ^3H -Thymidin im Vergleich zum Operationstag nachzuweisen. Diese Unterschiede sind biologisch hochsignifikant ($p < 0,001$).

Bei einem Vergleich zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der mit der Nährlösung behandelten Versuchsgruppe ergibt sich sowohl bezüglich des Anteiles an freien Vorläufern als auch der DNS-Konzentration/g Gewebe sowie hinsichtlich des Prozentsatzes des zur DNS-Synthese utlisierten ^3H -Thymidin kein signifikanter Unterschied.

2. Versuchsreihe II

Die Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmung für die Kontroll- und Versuchsgruppe des 4.postoperativen Tages der Versuchsreihe II sind den Tabellen 10 und 11 im Anhang zu entnehmen. Die statistischen Werte sind aus Tabelle 3 ersichtlich.

Versuchsreihe II			rel.spez.Akt. in %	
Gruppe	n		Extrakt	Rückstand
Kontrollgr. (unbehandelt)	10	$\bar{M}$	58,96	49,72
		σ_E	13,97	15,68
Versuchsgr. (behandelt)	8	$\bar{M}$	82,73	50,39
		σ_E	53,19	10,10

Tabelle 3. Mittelwert $\bar{M}$ und Standardabweichung σ_E der relativen spezifischen Aktivität [%] des Perchlorsäure-Extraktes und des Rückstandes nach Extraktion für die Kontrollgruppe (n=10) und die Versuchsgruppe (n=8) der Versuchsreihe II.

Auch bei dieser Versuchsreihe ergibt sich weder in der relativen spezifischen Aktivität des Perchlorsäure-Extraktes (HClO_4 -Extrakt), d.h. in der Konzentration an freiem ^3H -Thyminidin, noch in der des Rückstandes, der die Einbaurrate von ^3H -Thyminidin in die DNS repräsentiert, ein biologisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$). Man muß daher annehmen, daß sowohl in der Größe der Proliferation als auch in der der Vaskularisation - wenn man die Konzentration an freiem Vorläufer mit der Durchblutungsgröße in Zusammenhang setzt - bezüglich des Wundbettes der unbehandelten Kontrolltiere und der mit Z_{16} behandelten Versuchstiere kein Unterschied besteht.

Die Einzelwerte der Histo-Autoradiographie sind in der Tabelle 12 im Anhang aufgeführt. Mittelwert und Standardabweichung sind aus der Tabelle 4 zu entnehmen.

Versuchsreihe II	^3H -Index [%]	
	Kontrollgr. (unbehandelt)	Versuchsgr. (behandelt)
$\bar{M}$	7,902	12,256
σ_E	3,259	5,090

Tabelle 4. Mittelwert $\bar{M}$ und Standardabweichung σ_E für den ^3H -Index [%] gemessen an Schnitten von je zwei Kontroll- und Versuchstieren der Versuchsreihe II.

Der aus den Mittelwerten der Tabelle 4 abzuleitende höhere ^3H -Index bei der behandelten Versuchsgruppe läßt sich auf Grund der erheblichen Streuungen - teilweise bedingt durch die schlechte Schnittqualität - statistisch nicht gegen den der unbehandelten Kontrollgruppe absichern ($p > 0,05$) und

muß daher als zufällig betrachtet werden. Das Ergebnis bestätigt die Resultate der übrigen, bereits beschriebenen Analysen.

Die planimetrische Bestimmung der Wundflächen führte zu einem interessanten Ergebnis. Die statistischen Werte sind aus der Tabelle 5 zu ersehen. Einzelwerte siehe Anhang Tabelle 13.

Versuchsreihe II				
Gruppe	n		mittlerer Durchmesser [cm] der Wunde	Wundfläche [cm ²]
Kontrollgr. (unbehandelt)	10	$\bar{M}$	2,1091	3,5104
		σ_E	0,1616	0,5296
Versuchsgr. (behandelt)	8	$\bar{M}$	1,7119	2,3374
		σ_E	0,2319	0,6286

Tabelle 5. Mittelwert $\bar{M}$ und Standardabweichung σ_E für den mittleren Durchmesser der Wunde und die Wundfläche der Kontroll- und Versuchsgruppe der Versuchsreihe II.

Die Mittelwerte für Wundfläche und Durchmesser lagen bei der Versuchsgruppe hochsignifikant um 33,42 % (Wundfläche) und 18,83 % (Durchmesser) niedriger als bei der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Die behandelten Wunden zeigen damit die Tendenz eines schnelleren Wundschlusses als die unbehandelten.

Dieser Befund bestätigt die klinisch gemachten Beobachtungen [13] eines schnelleren Wundschlusses unter der Behandlung mit der Nährlösung Z₁₆. Wie bereits erwähnt (siehe Einleitung), ist die Anwendung einer feuchten Kammer allein (0,9%ige NaCl-Lösung)

ohne jeden Einfluß auf die Beschleunigung der Wundheilung [13]. Daraus ist klar ersichtlich, daß die spezifischen Inhaltsstoffe der Nährlösung diese Optimierung der Wundheilung beeinflussen.

IV. Diskussion =====

Die vorliegenden Untersuchungen beinhalten die Frage nach einer möglichen Einwirkung einer hautepithelspezifisch wirksamen Nährlösung (Z_{16}) auf eine Proliferationssteigerung im Bereich des Wundbettes und einen damit verbundenen beschleunigten Heilungsvorgang einer gesetzten Wunde. Dieser Einfluß könnte möglicherweise auf einen unbekannten Wirkfaktor in der Nährlösung zurückgeführt werden, der z.B. in der G_0 -Phase ruhende Zellen zu einem vermehrten Eintritt in den Generationszyklus veranlaßt. Das würde zwar auf Grund des Multiplikationsfaktors die schnellere Wundheilung erklären, hätte aber zur Folge, daß pro Gewichtseinheit des Wundbettes eine größere Zellzahl vorliegen müßte. Damit wäre unter Behandlung mit der Nährlösung gleichzeitig ein höherer DNS-Gehalt und eine vermehrte Utilisation von ^3H -Thymidin zu erwarten gewesen sowie auch ein höherer ^3H -Thymidin-Index.

Die Ergebnisse der Untersuchungen haben jedoch bei gleicher Operationstechnik - d.h. die Excision wurde exakt bis zur Faszie ohne Einbeziehung der Wundränder durchgeführt - gezeigt, daß weder im DNS-Gehalt noch in der ^3H -Thymidin-Utilisation und auch nicht im ^3H -Index Unterschiede zwischen einer mit der Nährlösung Z_{16} behandelten Versuchsgruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe bestehen. Das bedeutet,

daß pro Gewichtseinheit Wundbett gleiche Zellzahlen vorliegen müssen. Auf Grund dieser statistisch abgesicherten Ergebnisse muß die in der Fragestellung dieser Arbeit angenommene Vermutung eines Einflusses der NahrLösung Z_{16} auf die Größe der Proliferationsrate und der Vaskularisation im Wundbett ausgeschlossen werden.

Dagegen kann man aus den gewonnenen Ergebnissen eindeutig feststellen, daß zwischen dem Tag der Wundsetzung und dem 4. postoperativen Tag eine Proliferationssteigerung eingesetzt haben muß, da sowohl der DNS-Gehalt bzw. die Zellzahl/g Gewebe als auch die ^3H -Thymidin-Einbaurate in dieser Zeit signifikant angestiegen sind. Das könnte beinhalten, daß Unterschiede in der Zellgröße vorhanden sind. Es darf jedoch angenommen werden, daß vor allem die exsudative Phase am Operationstag durch Erhöhung von Körperflüssigkeit bzw. von Proteinen/g Gewebe zu diesen Unterschieden beigetragen hat, da unsere Ergebnisse auf Frischgewicht bezogen sind. Es läßt sich aber bestätigen, daß die Zellen des Wundbettes den Substanzverlust der Haut mit einer gesteigerten mitotischen Aktivität beantwortet haben, die ja nach HERNÁNDEZ-RICHTER [9] schon zwei Tage nach der Wundsetzung festzustellen ist.

Die in der Versuchsreihe I aufgefallene Differenz der Wundflächenausmaße am 4. postoperativen Tag zwischen der mit Z_{16} behandelten Versuchs- und der unbehandelten Kontrollgruppe führte in Versuchsreihe II bei planimetrischer Auswertung der mittleren Größe des Wundbettes zu einer überraschend hoch signifikanten Differenz. Man kann daraus entnehmen, daß die NahrLösung Z_{16} die Verkleinerung der Wundflächen beschleunigt und damit die Heilungszeit verkürzt.

Die Frage, in welcher Weise diese Verkleinerung der Wundflächen erreicht wird, kann durch diese Untersuchung allerdings nicht geklärt werden. Da ein stimulierender Einfluß der NahrLösung

auf die Proliferation der Zellen des Wundbettes nicht bewiesen werden kann, darf als Erklärung für den schnelleren Wundschluß unter der Behandlung mit Z_{16} eine vermehrte Proliferation der Zellen des Randepithels angenommen werden. Einen deutlichen Hinweis für eine derartige Möglichkeit geben morphologische und histo-autoradiographische Untersuchungsergebnisse im Tierexperiment [13]. Der Vergleich zwischen unbehandelten und mit der Nährlösung behandelten Wunden zeigte eine starke Auflockerung des randständigen Epithels und eine vermehrte Anzahl von Mitosen im stratum basale bei der behandelten Gruppe. Es wäre anhand dieser Befunde denkbar, daß die durch Z_{16} stimulierte Proliferation des Randepithels das Wachstum in Richtung des Gewebsdefektzentrums fördern könnte und dadurch eine beschleunigte Wundheilung herbeiführt. Ähnliche Beobachtungen hat man schon früher bei der Gewebezucht feststellen können [1]; alle Schichten des randständigen Epithels bewegten sich dabei geschlossen wellenartig auf das Defektzentrum zu.

Als rein spekulativ ist die Möglichkeit zu betrachten, daß die Nährlösung Z_{16} die Migration bzw. die Bildung der "ruffled membrane" [10] einzelner Epithelzellen am Wundrand begünstigt. Zu dieser Hypothese können die Ergebnisse unserer Untersuchungen auf Grund ihrer besonderen Methodik keinen Beitrag liefern, da die Zellen des Wundrandes dem gleichen 3H -Thymidin-Angebot unterlagen wie die Zellen des Wundbettes.

Für eine Beeinflussung der Wundkontraktion (siehe Einleitung) können unsere Untersuchungsergebnisse ebenfalls keinen Anhaltspunkt geben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Nähr-
lösung Z₁₆ die Zellen des Wundbettes in keiner Weise
beeinflußt, daß aber trotzdem eine signifikante Verkleinerung
der Wundflächen in einem bestimmten Zeitraum beobachtet
wurde. Die Erklärung hierfür liegt sehr wahrscheinlich
in einer unter der Behandlung mit Z₁₆ vermehrten Proliferation
des randständigen Epithels in Richtung des Defektzentrums
und einem damit verbundenen, schnelleren Verschluß der Wunde.

V. Zusammenfassung

=====

Aus klinischer Erfahrung ist erwiesen, daß die Nährlösung Z₁₆
- 1950 von M. PARSHLEY und H. S. SIMMS als hautepithelspezifisch
wirksame Substanz für in-vitro-Kulturen entwickelt - die
Wundheilung günstig beeinflußt, ja sogar die Heilungszeit
um ca. 50 % herabsetzen kann. Man konnte bereits nachweisen,
daß das randständige Epithel einer Wunde durch die Lösung
zu einer vermehrten mitotischen Aktivität stimuliert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation der Zellen
des Wundbettes, deren Steigerung die in vielen Fällen beob-
achtete vermehrte Einsprossung von Kapillaren zur Folge
haben mußte, unter dem Einfluß von Z₁₆ untersucht.

Bei weiblichen weißen Inzuchtratten wurden distal der
Schulterblätter auf der Mitte des Rückens ca. 450 mm² große
Wunden gesetzt, deren Flächen mit einer Stempelmarkierung
standardisiert wurden. In zwei Versuchsreihen wurden jeweils
zwei Gruppen miteinander verglichen: eine mit Z₁₆ behandelte
Versuchsgruppe, bei der die Verbände während 4 Tagen alle
6 Stunden befeuchtet wurden, und eine unbehandelte Kontroll-
gruppe. Den Tieren beider Gruppen wurde am 4. Tag post

operationem intraperitoneal bzw.intravenös radioaktiv markiertes ^3H -Thymidin injiziert. Zwei Stunden später wurde das Wundbett excidiert.

Bei der ersten Versuchsreihe wurde zum Vergleich noch eine Gruppe untersucht, bei der die Wundsetzung, die ^3H -Thymidin-Injektion und die Excision des Wundbettes am gleichen Tag durchgeführt wurden (O-Gruppe).

Bestimmt wurden die Konzentration an freiem ^3H -Thymidin und an für die DNS-Synthese utilizedem ^3H -Thymidin, die Konzentration der DNS/Gewichtseinheit Wundbett und die spezifische DNS-Aktivität.

In den Ergebnissen zeigte sich eine Erhöhung der Anzahl der Zellen in der Generationsphase am 4.postoperativen Tag gegenüber der O-Gruppe (=Operationstag), denn der photometrisch ermittelte DNS-Gehalt/g Gewebe und die ^3H -Thymidin-Einbaurate in die DNS stiegen auf etwa das Doppelte bzw. das 6-10fache an. Gleichzeitig konnte am Operationstag ein größerer Anteil an freiem ^3H -Thymidin nachgewiesen werden als vier Tage später.

Beim Vergleich der Kontroll- und Versuchsgruppen des 4.postoperativen Tages ergab sich jedoch kein biologisch signifikanter Unterschied in der Quantität sowohl des freien als auch des in der DNS-Synthese utilizeden ^3H -Thymidin. Auch die photometrische Bestimmung der DNS/g Gewebe und die Bestimmung des ^3H -Index mit Hilfe der Histo-Autoradiographie brachten entsprechende Ergebnisse, d.h. keine unterschiedliche Zellzahl pro Gewichtseinheit Wundbett.

Eine hochsignifikante Abweichung zwischen den beiden Gruppen ergab sich beim Vergleich der Wundflächengrößen am 4.Tag post operationem. Die Wundflächen der mit der Nahrlosung N_{10} behandelten Tiere waren um rund 30 % kleiner als die der unbehandelten.

Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse muß ein Einfluß der Nährlösung Z_{16} auf die Größe der Proliferation und Vaskularisation im Wundbett ausgeschlossen werden. Es liegt auf Grund von Befunden früherer Untersuchungen [13] nahe, anzunehmen, daß der beobachtete schnellere Wundschluß unter der Behandlung mit Z_{16} auf eine vermehrte Proliferation des randständigen Epithels und dessen verstärkte Wachstumstendenz in Richtung des Zentrums der Wunde zurückzuführen ist.

VI. Anhang

=====

O-Gruppe	spezifische Aktivität für A,B,C,D und Rückstand	relative spezifische Aktivität der Extraktionsfraktionen A,B,C		spezifische Aktivität der DNS
Tier Nr.	[dpm/g Tier]	[%]	[%]	[dpm/mg DNS]
1	1 121 100	23,23	5,00	12 426
2	951 877	8,17	1,41	4 672
3	1 090 800	7,40	0,76	2 518
4	917 263	11,05	7,60	25 183
5	896 880	32,60	4,37	14 480
6	813 702	40,28	7,14	23 659
7	877 383	34,35	3,22	10 670
8	896 880	9,59	3,73	9 270
$\bar{M}$	945 736	20,83	4,15	12 860
σ_E	-	13,46	2,44	8 133

Tabelle 6: Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmung für die O-Gruppe (n=8) der Versuchsreihe I vom Operationstag.

Kontroll- gruppe	spezifische Aktivität für A,B,C,D, Frisch- einwaage u. Rückstand [dpm/g Tier]	relative spezifische Aktivität der Extraktionsfraktionen A,B,C [%]	spezifische Aktivität der DNS [dpm/mg DNS]
Tier Nr.			
1	960 943	13,34	140 894
2	965 541	22,06	95 815
3	1 062 095	18,54	70 315
4	1 014 060	9,52	63 542
5	1 014 060	28,90	84 218
6	1 029 582	20,98	45 744
7	1 062 095	12,69	82 596
8	1 079 134	7,69	21 711
$\bar{M}$	1 023 439	16,72	75 604
σ_E	-	7,16	35 383

Tabelle 7: Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmung für die unbehandelte Kontroll-
gruppe (n=8) der Versuchsreihe I vom 4. postoperativen Tag.

<u>Versuchs- gruppe</u>	spezifische Aktivität für A,B,C,D, Frisch- einwaage u. Rückstand [dpm/g Tier]	relative spezifische Aktivität der Extraktionsfraktionen A,B,C [%]	spezifische Aktivität der DNS [dpm/mg DNS]
Tier Nr.			
1	1 024 355	17,77	132 908
2	999 000	20,07	92 549
3	1 067 714	16,59	140 629
4	1 034 862	14,77	72 329
5	1 079 134	11,81	58 883
6	1 096 728	18,75	24 554
7	1 159 759	10,49	25 014
8	974 869	6,85	66 444
$\bar{M}$	1 054 553	14,64	76 664
σ_E	-	4,56	43 638

Tabelle 8: Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmung für die mit Z₁₆ behandelte Versuchsgruppe (n=8) der Versuchsreihe I vom 4.postoperativen Tag.

O-Gruppe	ξ	DNS	spez. Konz. der DNS	Kontroll- gruppe	ξ	DNS	spez. Konz. der DNS	Versuchs- gruppe	ξ	DNS	spez. Konz. der DNS
Tier Nr.	[nm]	[μg]	[mg DNS/g]	Tier Nr.	[nm]	[μg]	[mg DNS/g]	Tier Nr.	[nm]	[μg]	[mg DNS/g]
1	0,196	44,0	4,0	1	0,170	38,5	6,0	1	0,168	38,0	4,0
2	0,160	35,4	3,0	2	0,097	23,0	7,0	2	0,140	32,0	4,0
3	0,125	29,0	3,0	3	0,152	34,5	6,0	3	0,155	35,3	3,0
4	0,186	42,0	3,0	4	0,135	31,0	5,0	4	0,200	44,8	5,0
5	0,177	40,0	3,0	5	0,212	47,0	5,0	5	0,180	40,5	6,0
6	0,097	23,0	3,0	6	0,157	35,7	6,0	6	0,214	47,7	9,0
7	0,176	39,7	3,0	7	0,215	48,0	8,0	7	0,197	43,2	8,0
8	0,139	31,8	4,0	8	0,238	53,0	5,0	8	0,203	45,2	5,0
$\bar{M}$	-	-	3,2	$\bar{M}$	-	-	6,0	$\bar{M}$	-	-	5,5
σ_E	-	-	0,0	σ_E	-	-	1,0	σ_E	-	-	2,0

Tabelle 9: Ergebnisse der photometrischen Analyse der Extraktionsfraktion D (DNS-Fraktion) für die O-Gruppe (n=8), die unbehandelte Kontrollgruppe (n=8) und die mit Z₁₆ behandelte Versuchsgruppe (n=8) der Versuchsreihe I.

<u>Kontroll-</u> <u>gruppe</u>	Extrakt		Rückstand	
	spez.Akt.	rel.spez. Akt.	spez.Akt.	rel.spez. Akt.
Tier Nr.	[dpm/g Tier]	[%]	[dpm/g Tier]	[%]
1	840 412	69,81	499 554	59,44
2	974 306	91,37	378 712	38,86
3	918 657	60,03	725 921	79,01
4	1 031 822	56,67	469 036	45,45
5	1 022 971	51,39	502 477	49,11
6	931 003	43,87	626 811	67,32
7	968 820	43,66	302 304	31,20
8	932 745	63,56	392 330	42,06
9	989 255	55,91	541 221	54,70
10	948 456	53,28	285 185	30,06
$\bar{M}$	955 845	58,96	472 355	49,72
σ_E	-	13,97	-	15,68

Tabelle 10: Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmung für die unbehandelte Kontrollgruppe (n=10) der Versuchsreihe II vom 4.postoperativen Tag.

<u>Versuchs- gruppe</u>	Extrakt		Rückstand	
	spez.Akt.	rel.spez. Akt.	spez.Akt.	rel.spez. Akt.
Tier Nr.	[dpm/g Tier]	[%]	[dpm/g Tier]	[%]
1	1 027 655	41,62	358 194	34,85
2	958 929	56,61	493 242	51,43
3	939 808	64,31	606 133	64,49
4	926 688	211,33	421 795	45,51
5	948 120	64,52	417 497	44,03
6	924 490	76,60	409 857	44,33
7	994 292	75,57	561 035	56,42
8	980 319	71,25	608 182	62,03
$\bar{M}$	962 538	82,73	484 491	50,38
σ_E	-	53,19	-	10,10

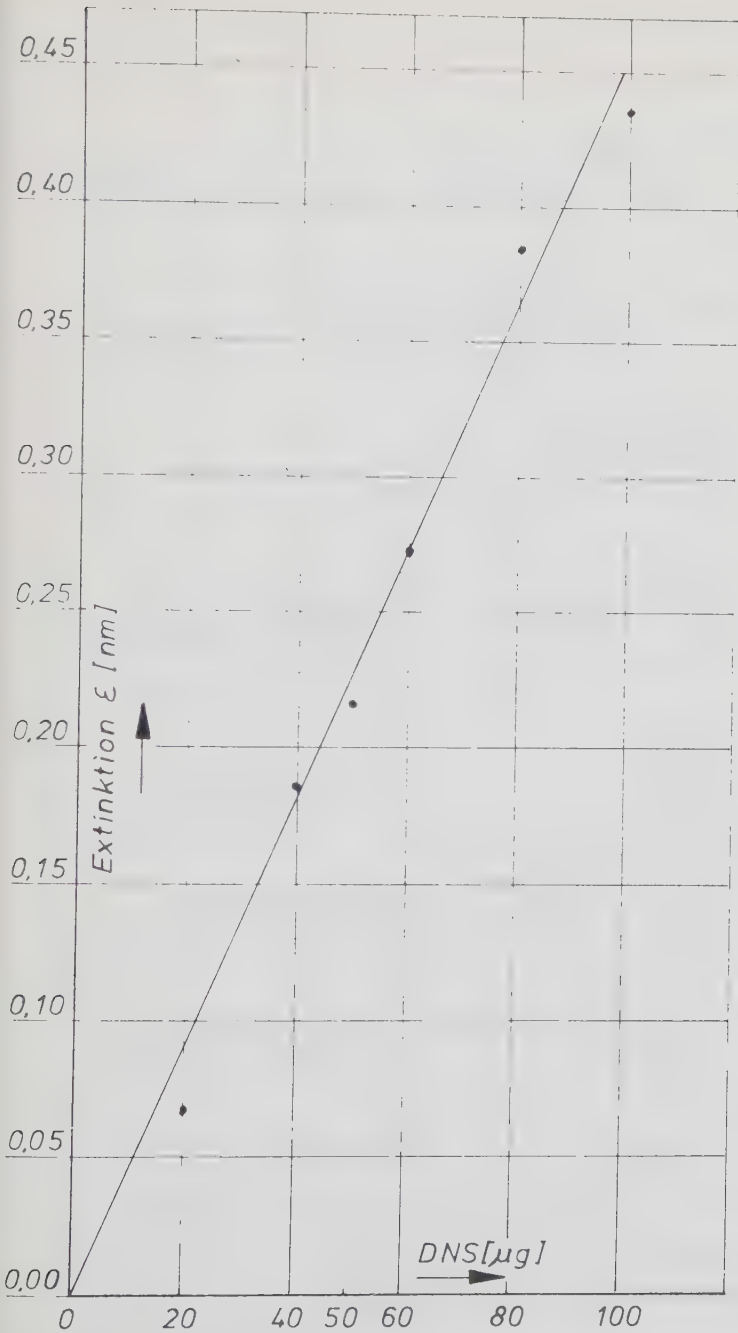
Tabelle 11: Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmung für die behandelte Versuchsgruppe (n=8) der Versuchsreihe II vom 4.postoperativen Tag.

<u>Kontrollgruppe</u> (unbehandelt)		<u>Versuchsgruppe</u> (behandelt)	
Schnitt Nr.	^3H -Index [%]	Schnitt Nr.	^3H -Index [%]
1	9,38	1	5,03
2	4,44	2	9,75
3	6,33	3	15,47
4	13,88	4	11,60
5	10,19	5	11,69
6	9,82	6	20,00
7	5,00		
8	10,30		
9	5,68		
10	4,00		
$\bar{M}$	7,902	$\bar{M}$	12,256
σ_E	3,259	σ_E	5,090

Tabelle 12: Ergebnisse der Histo-Autoradiographie
(^3H -Index) für die Kontroll- und Versuchs-
gruppe der Versuchsreihe II.

Kontroll- gruppe Tier Nr.	mittlerer Durch- messer der Wunde [cm]	Wundfläche [cm ²]	Versuchs- gruppe Tier Nr.	mittlerer Durch- messer der Wunde [cm]	Wundfläche [cm ²]
1	1,9225	2,9014	1	2,1125	3,5032
2	2,0188	3,1993	2	1,7175	2,3156
3	1,8325	2,6361	3	1,7713	2,4629
4	2,0750	3,3799	4	1,5138	1,7989
5	2,0788	3,3923	5	1,8775	2,7671
6	2,2975	4,1436	6	1,6975	2,2620
7	2,0775	3,3881	7	1,6725	2,1958
8	2,2200	3,8688	8	1,3325	1,3938
9	2,3175	4,2161			
10	2,2513	3,9787			
$\bar{M}$	2,1091	3,5104	$\bar{M}$	1,7119	2,3374
σ_E	0,1616	0,5296	σ_E	0,2319	0,6286

Tabelle 13: Ergebnisse der planimetrischen Bestimmung der Wundflächen für die unbehandelte Kontrollgruppe (n=10) und die mit Z₁₆ behandelte Versuchsgruppe (n=8) der Versuchsreihe II.



Eichkurve für die photometrische Bestimmung der DNS (Versuchsreihe I)

t-Test nach STUDENT

(nicht gepaarte Daten)

Gegeben sind zwei Kollektive $[x_i]$ und $[y_i]$.

Formeln:

$$\bar{x} = \frac{1}{n_x} \cdot \sum x_i \quad \text{arithmetisches Mittel der Werte}$$

$$s_x = \sqrt{\frac{SAQ_x}{n_x - 1}} \quad \begin{array}{l} \text{Standardabweichung des} \\ \text{Einzelwertes,} \\ SAQ_x = \text{Summe der Abweichungs-} \\ \quad \quad \quad \text{quadrate} \end{array}$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{n_x}} \quad \begin{array}{l} \text{Standardabweichung des} \\ \text{arithmetischen Mittels} \end{array}$$

$$s_{x+y} = \sqrt{\frac{SAQ_x + SAQ_y}{(n_x - 1) + (n_y - 1)}} \quad \begin{array}{l} \text{Standardabweichung} \\ \text{beider Kollektive} \end{array}$$

$$r_{\bar{x} - \bar{y}} = s_{x+y} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}} \quad \begin{array}{l} \text{Streuung der Differenz} \\ \text{der arithmetischen Mittel} \end{array}$$

$$t = \frac{\bar{y} - \bar{x}}{r_{\bar{x} - \bar{y}}} \quad \text{STUDENT-t-Wert}$$

Entsprechende Formeln gelten auch für $[y_i]$.

VII. Literaturverzeichnis

=====

1. BAUER, K.F.: Methodik der Gewebezüchtung.
Stuttgart: Hirzel 1954.
2. BILLINGHAM, R.E. und RUSSELL, P.S.:
Studies on Wound Healing, with Special
Reference to the Phenomenon of
Contracture in Experimental Wounds
in Rabbit's Skin.
Annals of Surgery Vol. 144. 1956. S. 961.
3. CHRISTOPHERS, E. und BRAUN-FALCO, O.:
Stimulation der epidermalen DNS-Synthese
durch Vitamin-A-Säure.
Arch. Klin. Exp. Derm. Bd 232. 1968. S. 427-433.
4. CHRISTOPHERS, E. und SCHAUMLOFFEL, E.:
Zur DNS-Synthesezeit in der menschlichen
Epidermis.
Arch. f. klin. u. exp. Derm. Bd 228. 1967. S. 57.
5. CUTHBERTSON, A.M.: Contraction of Full Thickness Skin
Wounds in the Rat.
Surg. Gynec. Obstet. Vol. 108. 1959. S. 421-432.
6. GLOOR, M., KÖHLER, J., KLEIN, P. und FRIEDERICH, H.C.:
Deckung von Hautdefekten mit einem autologen
Hauthomogenisat und Wundkontraktion.
Z Hautkr. Bd 48 (18). 1973. S. 755.
7. HEGEMANN, G.: Experimentelle Studie über die Bedeutung
und die Ursachen der Wundkontraktion bei
der Wundheilung.
Brun's Beitr. Klin. Chir. Bd 180. 1950. S. 229-242.
8. HEGEMANN, G., TRAUT, F. und von WALLENSTERN, L.:
Untersuchungen über tierische Wundhormone.
Arch. Klin. Chir. Bd 266. 1950. S. 515-534.

9. HERNÁNDEZ-RICHTER, H.J. und STRUCK, H.:
Die Wundheilung. Theoretische und
praktische Grundlagen.
Stuttgart: Thieme 1970.
10. HOWES, E.L.: The Rate and Nature of Epithelization
in Wounds with Loss of Substance.
Surg. Gynec. Obstet. Vol. 76. 1943. S. 738.
11. HUNTER, J.: Treatise on the blood, inflammation
and gunshot wounds. London 1794.
zitiert nach: HERNÁNDEZ-RICHTER (s. 9)
12. KLEIN, P.: Die chronische Hautwunde.
Hefte zur Unfallheilkunde 114.
Deutsch-Österreichisch-Schweizerische
Unfalltagung, Bern 1972.
13. KLEIN, P.: Autologe Hautzüchtung auf Wunden als
Methode plastischer Deckung. Tierexperi-
mentelle Untersuchungen und klinische
Erfahrungen.
Habilitationsschrift Marburg 1972.
14. KLEIN, P.: Der Verschluss von Wunden durch Züchtung
randständigen Epithels. Experimentelle
Untersuchungen.
Res. exp. Med. Bd 158. 1972. S. 298.
15. LINDQUIST, G.: The Healing of Skin Defects. An Experimental
Study on the White Rat.
Acta chir. Scand. Bd 94. Suppl. 107.
16. MORRISON, L.M. und Mitarbeiter:
Aging cell and arteriosclerotic tissue
response to treatment with acid
mucopolysaccharides.
7. Intern. Congr. Gerontology. Wien 1966. S. 57.
zitiert nach: HERNÁNDEZ-RICHTER (s. 9.)

17. PARSHLEY, M. und SIMMS, H.S.:
Amer. Journ. Anat. Vol. 86. 1950. S. 163.
18. PEACOCK, E. E. und VAN WINKLE, W.:
Surgery and Biology of Wound Repair.
W. B. Saunders Comp. 1970.
19. FORIES, W. J. und STRAIN, W. H.:
Zinc and wound healing.
In: Zinc metabolism. III. 1966.
Springfield: Thomas.
zitiert nach: HERNÁNDEZ-RICHTER (s. 9.)

Die Anregung zu dieser Arbeit ging von Herrn Prof.Dr.P.KLEIN aus, dem ich hierfür und für die stetige Förderung zu großem Dank verpflichtet bin.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof.Dr.E.SCHAUMLOFFEL für sein Interesse an dem Thema, seine wertvollen Hinweise und sein Entgegenkommen, das mir die Durchführung der Arbeit ermöglicht hat.

Zu danken habe ich ferner Herrn Prof.Dr.H.SCHNELL dafür, daß er freundlicherweise das zusätzliche Correferat übernommen hat.

Ebenso möchte ich an dieser Stelle den Angehörigen des Institutes für Strahlenbiologie und medizinische Isotopenanwendung, besonders Fräulein CLAUSMITZER, Frau MÖLVERSTEDT und Frau THOME, für die bereitwillige Unterstützung bei den Laboruntersuchungen und der statistischen Auswertung meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf

=====

Am 13.1.1951 wurde ich als einziges Kind des Dr.-Ing.Rolf IBING und seiner Ehefrau Ilse,geb.Franz, in Hannover geboren. Im Jahre 1955 zogen wir nach Offenbach/Main um, wo ich Ostern 1957 in die Eichendorff-Schule eintrat. 1961 wurde ich in die Albert-Schweitzer-Schule (Gymnasium) aufgenommen, in der ich am 9.6.1969 die Reifeprüfung im neusprachlichen Zweig bestand.

Mit dem Wintersemester 1969/70 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn. Ich absolvierte die naturwissenschaftliche Vorprüfung nach dem Sommersemester 1970, die zahnärztliche Vorprüfung nach dem Wintersemester 1971/72. Im Anschluß an das Sommersemester 1974 werde ich die zahnärztliche Prüfung ablegen.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen
und Herren Professoren und Dozenten

Amon, Aurich, Bode, Braasch,
Castenholz, Dehnicke, Dimroth,
Golenhofen, Hennis, Hensel,
Hering, Heuser, Janke, Karlson,
Klein, Koecke, Koransky, Kühnel,
Mann, Niemeyer, Petry, Pfütz,
Rohen, Rupec, Schaumlöffel,
Schienbein, Schiff, Schmid,
Schmidt, Schmitz-Moormann,
Schnell, Seidel, Walcher.

